

## アブラナ属花粉アレルゲンの分子遺伝学的研究

著者	岡田 崇
号	610
発行年	1999
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16201">http://hdl.handle.net/10097/16201</a>

氏 名(本籍)	おか 岡	だ 田	たかし 崇
学 位 の 種 類	博	士	(農 学)
学 位 記 番 号	農	博	第 6 1 0 号
学位授与年月日	平	成	12 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科農学専攻 (博士課程)		
学位論文題目	アブラナ属花粉アレルゲンの分子遺伝学的研究		

論文審査委員	(主 査)	教 授	西	尾	剛
		教 授	江	原	淑 夫
		教 授	山	谷	知 行
		助教授	鳥	山	欽 哉

# 論文内容要旨

## 緒言

近年、花粉症患者は増加の一途をたどり、大きな社会問題となってきた。日本ではスギ花粉症がその 80%以上を占め、くしゃみ・鼻水・目のかゆみ等の症状を引き起こす。花粉症は、IgE 抗体とアレルゲンとの抗原・抗体反応の結果引き起こされ、原因となる物質（アレルゲン）は花粉中の様々なタンパク質である。現在までに、多くの花粉アレルゲンをコードする遺伝子が単離され、花粉症の診断や免疫療法への利用が検討されている。

アブラナ(*Brassica*)属の植物は、採油用ナタネ、ブロッコリー、キャベツ、カブなど世界中で広く栽培されている。これらの花粉は、生産地周辺の住民や職業的に接する人にとって主要な花粉症の原因となることが最近の研究で明らかとなってきた。しかし、アブラナ属の花粉アレルゲン遺伝子は単離されていなかった。

本研究では、アブラナ属の花粉アレルゲン遺伝子を単離してアレルゲンとしての特徴を解析し、免疫療法への利用を検討した。また、植物花粉における機能を明らかにするために、分子遺伝学的解析を行った。

## 第1章 アブラナ属花粉アレルゲン cDNA のクローニングとシーケンス解析

アブラナ(*Brassica rapa*)の成熟葯から作成した cDNA 発現ライブラリーの IgE イムノスクリーニングを行い、花粉アレルゲンをコードする cDNA クローンを 2 種類単離した(*Bra r 1* と *Bra r 2*)。既知の遺伝子との相同性検索の結果、EF-hand と呼ばれる  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位を持つ  $\text{Ca}^{2+}$  結合タンパク質(CaBP)との相同性が見られた。*Bra r 1* と *Bra r 2* は Calmodulin (CaM)とそれぞれ 41%の相同性を示し、 $\text{Ca}^{2+}$  結合部位が良く保存されていた。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$  結合部位以外の領域での相同性は低く、新規の CaBP であった(Fig. 1-1)。*Bra r 1* と *Bra r 2* は CaM 分子の約半分の分子量で、 $\text{Ca}^{2+}$  結合部位も半分の 2 ヶ所存在し、Fig. 1-2 に示すように 2 分

子の  $\text{Ca}^{2+}$  と結合すると考えられた。さらに大腸菌で発現させた組換えタンパク質を用いて、 $\text{Ca}^{2+}$  と結合することを確認した。

## 第2章 Bra r 1 の IgE 反応と免疫療法への利用

Bra r 1 は  $\text{Ca}^{2+}$  と結合することにより立体構造が変化すると考えられたので、本章では、Bra r 1 と  $\text{Ca}^{2+}$  の結合が IgE 抗体との反応におよぼす影響を調べた。まず、組換え Bra r 1 タンパク質(rBra r 1)と  $\text{Ca}^{2+}$  との結合を EGTA で阻害したところ、rBra r 1 に対する IgE 抗体の結合能が大きく低下する患者が見られた。

次に Figure 2-1 で示したように、それぞれの EF-hand の  $\text{Ca}^{2+}$  結合ループのアミノ酸を置換し、Bra r 1 の 2 つの  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位の片方または両方を潰した 3 種類の変異 Bra r 1 の組換えタンパク質を作成し、それぞれ mu1, mu2, muW とした。これらの組換えタンパク質を精製し  $\text{Ca}^{2+}$  結合能を調べた結果、mu1 と mu2 では  $\text{Ca}^{2+}$  結合が wild-type の約半分に減少し、muW では完全に  $\text{Ca}^{2+}$  結合能を失っていることがわかった(Fig. 2-2)。

変異 Bra r 1 と IgE 抗体との反応を inhibition ELISA 法により調べた。その結果、変異 Bra r 1 は IgE 抗体との結合能が大きく低下した。特に EF-hand 2 に変異を持つ mu2 と muW の IgE 結合能が著しく減少していた(Fig. 2-3)。また、イムノブロットにおいても、mu2 と muW は患者 IgE に対する結合能が減少し、inhibition ELISA で得られた結果と一致した。

次に、IgE 反応性の低くなった変異 Bra r 1 がアレルゲン特異的免疫療法に使えるかどうかを評価するために、変異タンパク質をワクチンとしてマウスに免疫した。その結果、変異 Bra r 1 (mu1, mu2 および muW)に対する IgG 抗体が産生され、それぞれの IgG 抗体は、組換え Bra r 1 および花粉抽出物中の Bra r 1 と反応することがイムノブロットにより明らかとなった(Fig. 2-4)。抗変異 Bra r 1 マウス血清と患者血清を混ぜて rBra r 1 と反応させたところ、ヒト IgE 抗体の rBra r 1 に対する結合が顕著に阻害された。これはマウス IgG とヒト IgE が競合

した結果であると考えられる。これらの結果より、変異 *Bra r 1* を免疫療法へ利用することが可能であると考えられた。

### 第3章 *Bra r 1* と *Bra r 2* の遺伝子発現の解析

*Bra r 1* と *Bra r 2* の花粉における機能を推定するために、その遺伝子発現とタンパク質の局在を解析した。*Bra r 1* と *Bra r 2* は葯と花粉で特異的に発現しており、その成熟に伴って発現量は増大した(Fig. 3-1)。また、*In situ* ハイブリダイゼーション分析を行い、*Bra r 1* と *Bra r 2* は花粉と花粉を取り巻くタペート組織で発現していることを明らかにした。

葯と花粉管における *Bra r 1* タンパク質の局在について免疫組織化学的解析を行った。葯の切片における *Bra r 1* タンパク質を検出したところ、花粉粒内とタペート組織に局在しており(Fig. 3-2)、*in situ* ハイブリダイゼーション分析の結果と一致した。免疫電子顕微鏡法でさらに詳細な *Bra r 1* の局在を観察したところ、*Bra r 1* の存在を示す金粒子は、タペート組織と花粉の細胞質そして花粉外被の *tryphine* で検出された。*tryphine* に存在する *Bra r 1* は、タペート組織で合成され、葯の発達後期に *tryphine* へ付与されたと考えられる。花粉外被タンパク質と内部タンパク質を別々に抽出することにより、*Bra r 1* と *Bra r 2* は花粉外被には少量存在し、大部分が花粉内に蓄積していること、そしてそれらが花粉の水和の際に、外の水溶液中に溶出しやすいことを明らかにした(Fig. 3-3)。

アブラナのと合または不和合の花粉を受粉した雌しべの縦断切片を作成し、*in vivo* で伸長した花粉管における *Bra r 1* を検出した。自家受粉を行い花粉管の伸長が起こらない雌しべでは、*Bra r 1* の局在を示すシグナルは柱頭上に残った花粉でのみ検出された(Fig. 3-4A)。一方、他家受粉の雌しべでは、花柱内の誘導組織にある花粉管、柱頭上に残っている花粉、および乳頭細胞で *Bra r 1* が検出された(Fig. 3-4B)。これらの結果から、*Bra r 1* が花粉管伸長に関与することが示唆された。

#### 第4章 *Bra r 1* ゲノミッククローンの単離とタバコへの遺伝子導入

本章では *Bra r 1* のゲノミッククローンを単離し、*Bra r 1* のゲノム構造の解析とプロモーター解析を行った。*Bra r 1* のゲノミックサザン分析を行った結果、アブラナとケールにおいて、それぞれゲノム中に1コピー存在していることが明らかとなった。

アブラナのゲノミックライブラリーをスクリーニングし、*Bra r 1* のゲノミッククローンを単離した。そして *Bra r 1* をコードする領域を含む 3.2 kb *Hind*III 断片の全塩基配列を決定した。既知の花粉特異的プロモーターのシスエレメントと *Bra r 1* のプロモーター領域 (2.6 kb) の塩基配列を比較した結果、花粉特異的発現を誘導する PB core motif や LAT56/59 box と相同性の高い配列が *Bra r 1* プロモーター中に見いだされた(Fig. 4-1)。

*Bra r 1* プロモーター領域 (2.6 kb 断片) に GUS 遺伝子を連結したコンストラクト pBI-BG (Fig. 4-2A)を導入したタバコを作成し、花粉管伸長時の GUS 活性を解析した。受粉した雌しべの花柱を切断し、花粉管伸長培地に切断部をつけて伸長させた *semi vivo* の花粉管(Fig. 4-2B)においては、花粉管全体が青く染まったが、花粉管の先端部で、やや強い GUS 染色が見られた(Fig. 4-2D and E)。これより花粉管においても *Bra r 1* のプロモーター活性があることが示唆された。

タバコの成熟花粉は、栄養細胞と雄原細胞からなる。そこで *Bra r 1* がそのどちらで発現しているかを解析するために、*Bra r 1* プロモーターの下流に核移行シグナルのついた *GFP* を連結し、これをタバコに導入した。その結果、*GFP* の蛍光は栄養核で検出され、栄養細胞で特異的に発現していることが明らかとなった(Fig. 4-3)。

#### 第5章 タバコの *Bra r 1* ホモローグの単離と遺伝子発現の解析

アブラナは *in vitro* での花粉管伸長が容易でないため、花粉管伸長実験に適し

ていない。そこで花粉管伸長実験の容易なタバコで *Bra r 1* のホモログを単離し、その発現を解析した。単離した cDNA クローンの塩基配列を決定したところ、アブラナの *Bra r 1*・*Bra r 2* と同じように 2 種類の CaBP に分類された(*Nic t 1* と *Nic t 2*)。 *Nic t 1* と *Nic t 2* は、近年様々な植物から花粉アレルゲン遺伝子としてクローニングされてきた *Bra r 1* タイプの CaBP と高い相同性(62-80%)を示した(Fig. 5-1)。これらは *Nic t 1* と *Nic t 2* に対する他の植物種のホモログであると考えられ、2つの  $\text{Ca}^{2+}$  結合部位および C 末端側の疎水性領域が特に良く保存されていた。

*Nic t 1* タンパク質の花粉管における局在を蛍光抗体法で解析したところ、*Nic t 1* の存在を示す FITC の蛍光は、花粉管の細胞質領域に一様に観察された(Fig. 5-1)。花粉管伸長と細胞内のカルシウム分布は密接な関係にあり、*Bra r 1* タイプの CaBP である *Nic t 1* は細胞内カルシウムのレセプターとして、花粉管伸長に関与していると考えられた。

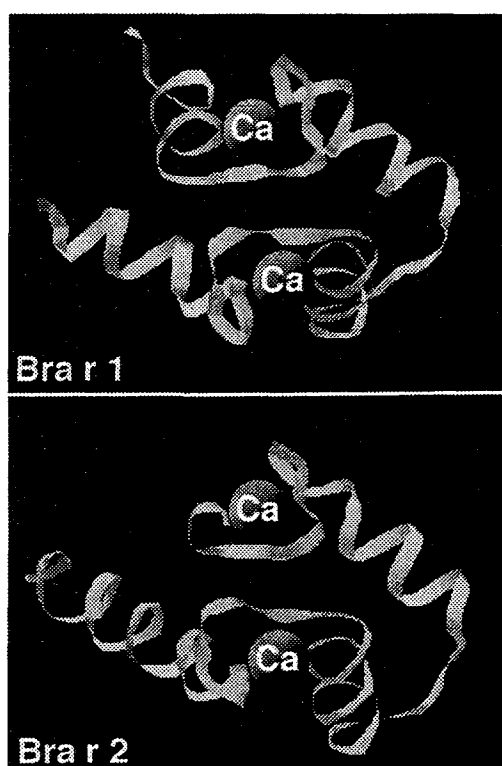
## 結語

アブラナ属で初めて花粉アレルゲン遺伝子 *Bra r 1* をクローニングし、*Bra r 1* と  $\text{Ca}^{2+}$  との結合がヒト IgE 抗体との反応に重要であることを明らかにした。また、 $\text{Ca}^{2+}$  と結合しない変異 *Bra r 1* がアレルゲン特異的な免疫療法へ利用できる可能性を示した。*Bra r 1* タイプの花粉アレルゲンの間では、IgE 抗体に対する交差反応性が高く、本研究で作成した変異 *Bra r 1* は、多くの植物種の *Bra r 1* タイプのアレルゲンに特異的な花粉症治療に利用できると思われる。

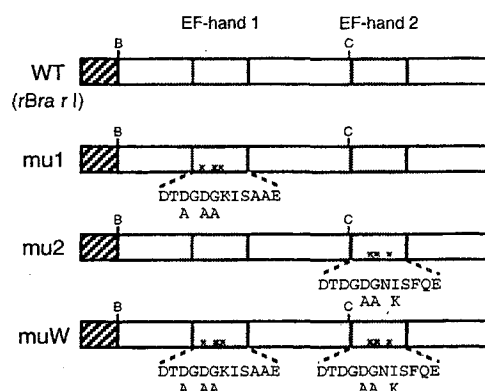
*Bra r 1* タイプの CaBP は被子植物に広く存在しており、花粉で特異的に発現していることを明らかにした。そのシーケンス解析、発現解析およびタンパク質の花粉管における局在から、花粉管伸長への関与が示唆された。また、*Bra r 1* は花粉管細胞質のカルシウム濃度勾配の形成やカルシウムを介したシグナル伝達に関わっていると推定された。

	<---- EF-hand 1 ---->	<---- EF-hand 2 ---->	
	x y z-y-x -z	x y z-y-x -z	
ACaM-2	74 RKMKDTSEELKEAFRVFDKQNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIKEADVDDGGQINYEYFVVMMAK	148	Ca=4
Bra r 1	MAD-----AEHERIFKKFDTGDKISAAELEEALKKLGSVTPDDVTRMMAKIDTDGDNISFQEFTEFASANPGLMKDVAKVF	79	Ca=2
Bra r 2	***--ATER***D*****AN*****S**GD***N**--H**IK*****E*****Y**Y***SD*****R*****I*	83	Ca=2

**Figure 1-1.** Comparison of amino acid sequences of Bra r 1 and Bra r 2 with *Arabidopsis* calmodulin, ACaM-2. The two EF-hand motifs are shown above the sequences. The coordinating residues in the Ca<sup>2+</sup>-binding loop are marked (x, y, z, -y, -x, -z). Colons and dots indicate identical and similar residues, respectively. Numbers of residues are shown on the right. Asterisks and hyphens indicate identical residues of Bra r 1 and gaps in sequences, respectively. Ca = a number of binding calcium.

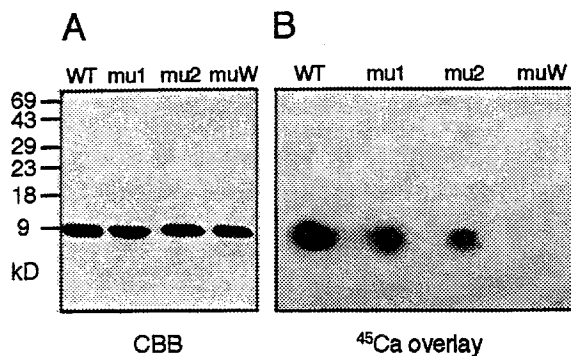


**Figure 1-2.** Calcium-binding motif of Bra r 1 and Bra r 2. Protein structure was predicted by Swiss-Model and visualized by RasMol. ~ 3D-structures were predicted by amino acid sequences from Ala<sup>2</sup> to Asn<sup>68</sup> for Bra r 1 and Met<sup>1</sup> to Phe<sup>65</sup> for Bra r 2, respectively.

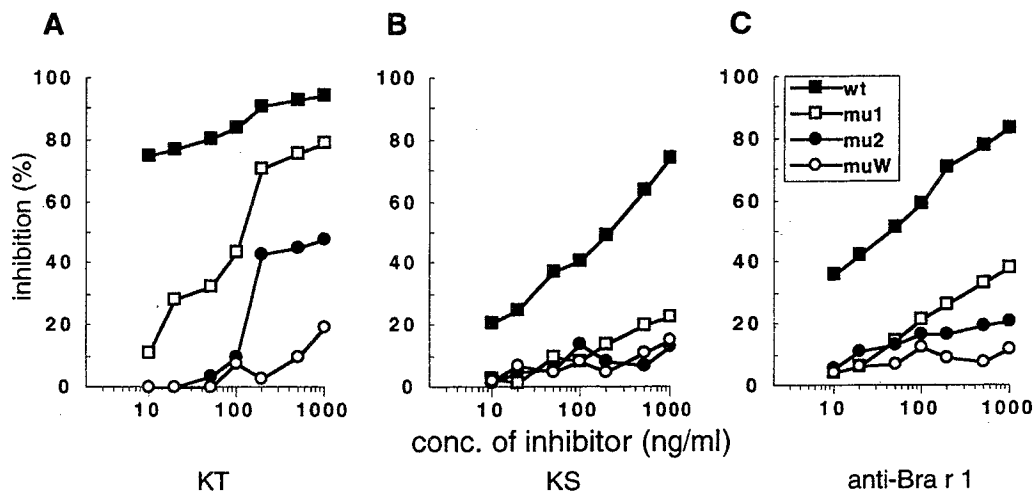


**Figure 2-1.** Schematic representation of the structure of Bra r 1 mutants. Hatched boxes and shaded boxes represent histidine tags and Ca<sup>2+</sup>-binding loops in EF-hand motif, respectively. Amino acid sequences of Ca<sup>2+</sup>-binding loops are given below the structures. Cross marks in the EF-hand domains indicate the positions of the point mutations. WT; wild type Bra r 1 fused with histidine tag, mu1; Bra r 1 mutated in EF-hand 1, mu2; mutation in EF-hand 2, muW; mutation in both EF-hands. *Bam*HI and *Cl*aI sites used for construction of the double mutant are indicated B and C, respectively.

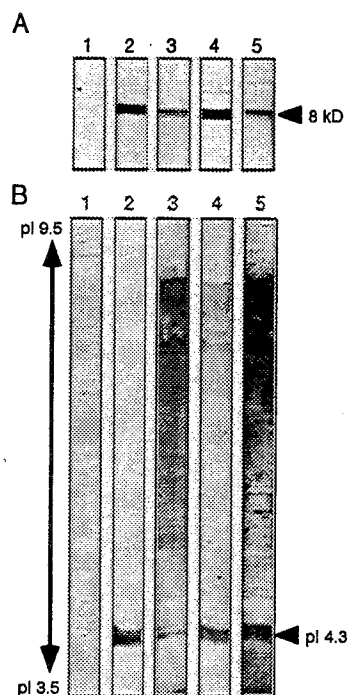




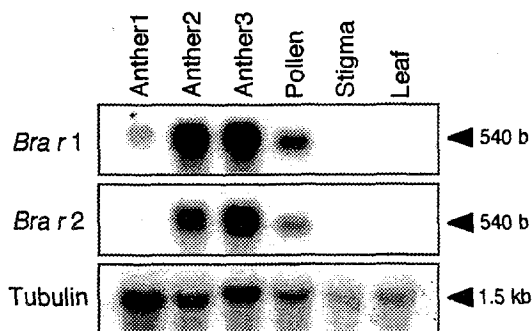
**Figure 2-2.** Calcium binding ability of Bra r 1 mutants. Affinity-purified recombinant proteins of wild type Bra r 1 (WT) and three  $\text{Ca}^{2+}$ -binding deficient mutants of Bra r 1 (mu1, mu2 and muW) were separated by SDS-PAGE. (A) Coomassie Brilliant Blue-stained gel. (B) An autoradiogram of a blot overlaid with  $^{45}\text{Ca}$  solution.



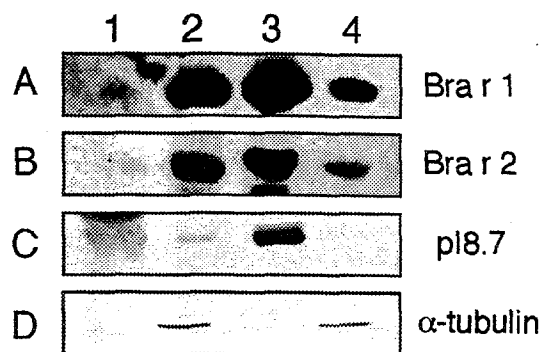
**Figure 2-3.** Inhibition of antibody binding to immobilized rBra r 1 using Bra r 1 variants. Antibody binding to rBra r 1 was inhibited by preincubation of sera from patient KT (A), patient KS (B), and anti-Bra r 1 (C) with increasing concentration of wild-type Bra r 1 (filled square), mu1 (open square), mu2 (filled circle) and muW (open circle) recombinant protein.



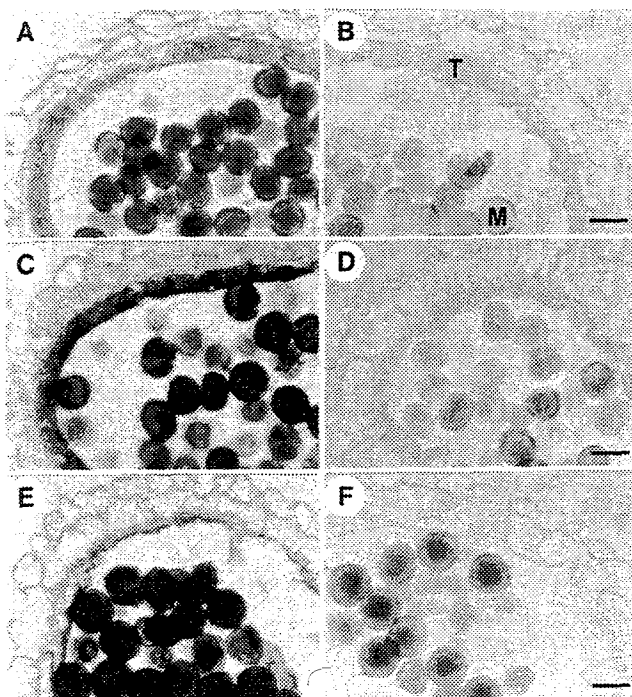
**Figure 2-4.** Immunoblot analysis of recombinant Bra r 1 (A) and *Brassica* pollen extracts (B). Recombinant Bra r 1 and pollen extracts were separated by SDS-PAGE and IEF, respectively, and blotted onto PVDF membranes. Membrane strips were incubated with mouse preimmune serum (lane 1), anti-Bra r 1 (lane 2), anti-mu1 (lane 3), anti-mu2 (lane 4) or anti-muW (lane 5) antisera. Binding IgG was detected by color development. Arrowheads indicate the position of Bra r 1.



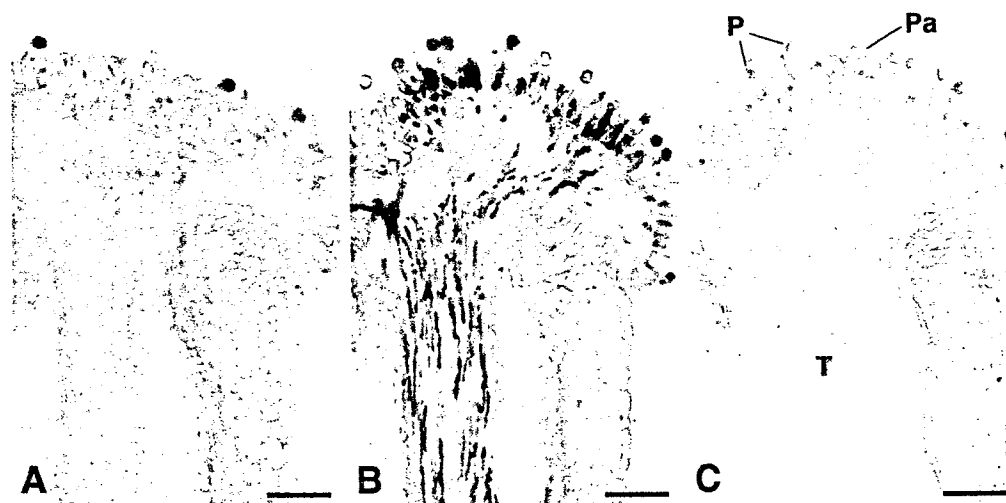
**Figure 3-1.** Northern blot analysis of *Bra r 1* and *Bra r 2*. Total RNA was isolated from anthers during pollen development and from stigmas and leaves of *B. rapa*. The blot was probed with each cDNA. The same blot was reprobbed with tubulin cDNA to check the integrity of RNA. Anther 1, anther containing uninucleate microspores; Anther 2, anther containing bicellular pollen; Anther 3, anther containing mature pollen.



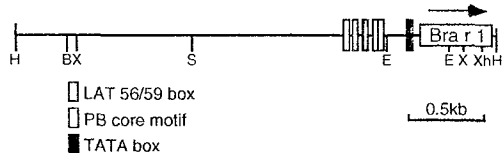
**Figure 3-3.** Distribution of *Bra r 1* and *Bra r 2* proteins in pollen coat fraction and intracellular fraction of mature pollen of *B. rapa*. The pollen coat proteins were extracted by using cyclohexane (lane 1) and the extracellular proteins were extracted by suspending pollen grains in tris-buffer (lane 3). Intracellular proteins were extracted after extraction with cyclohexane (lane 2) or tris-buffer (lane 4). Proteins (25  $\mu$ g) in each fraction were separated by IEF for the detection of *Bra r 1*, *Bra r 2*, and pI8.7 protein as a control of extracellular proteins, or SDS-PAGE for  $\alpha$ -tubulin as a control of intracellular proteins. The protein blots were reacted with anti-*Bra r 1* (A), anti-*Bra r 2* (B), anti-pollen coat antibody (C), and anti- $\alpha$ -tubulin antibody (D).



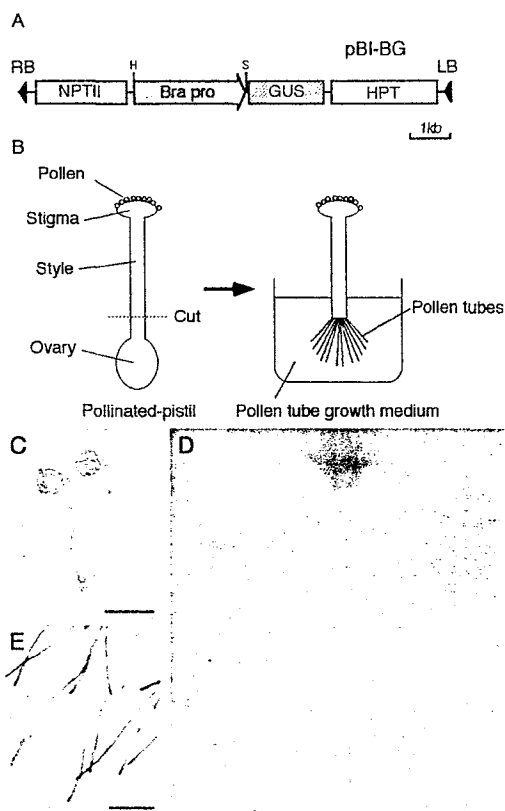
**Figure 3-2.** Immunolocalization of *Bra r 1* in anthers of *B. rapa* at various developmental stages. *Bra r 1* on the sections was detected by reaction with anti-*Bra r 1* antibody (A, C and E). As controls, sections were stained as above except for the omission of primary antibody (B, D and F). Sections of anthers contained uninucleate microspores (A and B), bicellular pollen (C and D) and tricellular pollen (E and F). The presence of *Bra r 1* is observed as dark staining. M, microspores; T, tapetum cells. Bars = 20  $\mu$ m



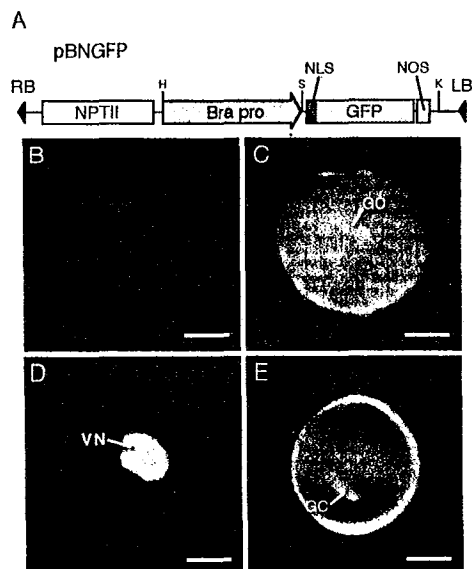
**Figure 3-4.** Immunolocalization of *Bra r 1* in the longitudinal sections of self- or cross-pollinated pistils. *B. rapa* *S*<sup>8</sup> homozygous plants were self-pollinated (A) or cross-pollinated with *S*<sup>9</sup> pollen (B and C), and left for 2 h. Sections were reacted with (A and B) or without (C) anti-*Bra r 1* antibody. P, pollen; T, transmitting-tissue; Pa, papillar cell. Bars = 100 μm



**Figure 4-1.** Restriction map of the 3.2 kb *Hind*III fragment of *Bra r 1* genomic DNA. The *Bra r 1* coding sequence is located near the end of this fragment. Gray, white and black boxes indicate the LAT 56/59 box, PB core motif and TATA box, respectively. The restriction sites indicated are as follows: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; S, *Sph*I; X, *Xba*I; Xh, *Xho*I.



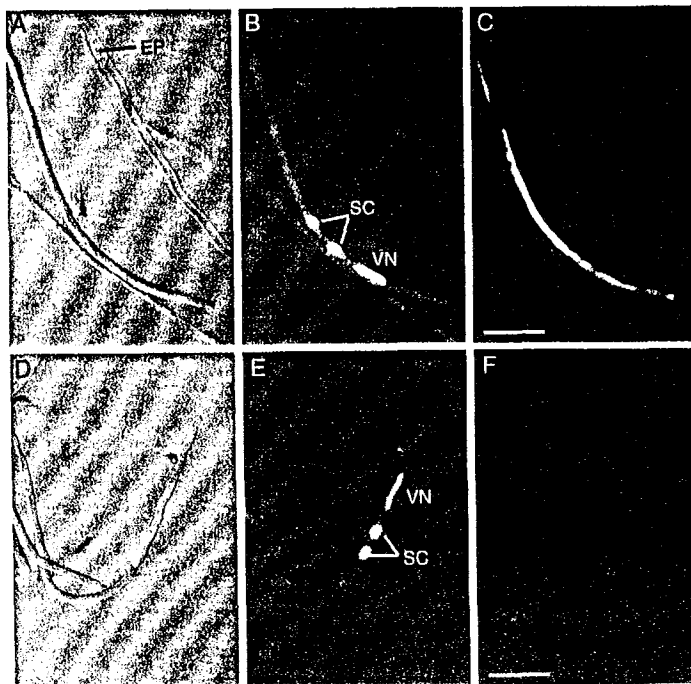
**Figure 4-2.** (A) Construction of transformation vector pBI-BG. Abbreviations: *NPTII*, gene for kanamycin resistance; *HPT*, gene for hygromycin resistance; *Bra pro*, promoter sequence of *Bra r 1*; *GUS*, β-glucuronidase; RB and LB, right and left borders of T-DNA; H and S, *Hind*III and *Sal*I sites used for inserting the *Bra r 1* promoter. (B) Schematic representation of *semi vivo* pollen tube growth of *Nicotiana tabacum*. (C-E) Histochemical GUS staining of pollen tubes of pBI-BG transformed *N. tabacum*. (C) *In vitro* germinated pollen tubes of BI-BG tobacco, transgenic No. 12. *Semi vivo* germinated pollen tube of BI-BG tobacco, No. 33 in lower (D) and higher (E) magnification. *Semi vivo* pollen tubes were sharp and germinated straightly, and blue staining was stronger in the extreme tip region. Bars in (C) = 50 μm (E) = 200 μm.



**Figure 4-3.** Vegetative nuclear specific expression of Bra r 1 in tobacco pollen. (A) Construction of transformation vector pBNGFP. Abbreviations: *NPTII*, gene for kanamycin resistance; *Bra pro*, promoter sequence of *Bra r 1*; *NLS*, nuclear localization signal; *GFP*, green fluorescent protein; *NOS*, nos terminator; *RB* and *LB*, right and left borders of T-DNA; *H*, *HindIII*; *K*, *KpnI*; *S*, *SalI* sites. Pollen grains of non-transformant (B) and BNGFP tobacco (D) were examined under an epifluorescence microscope. Nuclear DNA staining of the same pollen grains was shown in right panel (C and E). GC, generative cell; VN, vegetative nuclear. Bars = 10  $\mu$ m.

	EF-hand 1	EF-hand 2	
	x y z -y -x -z	x y z -y -x -z	
Nic t 1	MAE--DPQDIADRERIFKRFDLNGDGKISSAELGETLKMGLSVTSEEVQHMMALD TDGDFISYEEFEFARANRGLIKDVAKVF		84
Nic t 2	...AD.....A...Q...AT.....QT.....P...KY...D...I...NK.....FQ...I.....R...I		86
Bra r 1	..DA-----EH.....K...TD.....A...E...A...K.....PDD...TR...KI.....N...FQ...T...S...P...M.....		79
Bra r 2	..DAT---EK.EHD...K...A.....AS...DA...N.....HDDIKR...I.....Y...Q...SD...S.....M.....I		83
Aln g 4	..D-DH...Q.EH.....C...A.....AS...DA...T.....PD...K.....I.....FQ...TN.....V.....I		85
Bet v 4	..D-DH...K.E.....A.....A.....A...T...I...PD...K.....I.....FQ...TD...G.....L.....I		85
Ole e 3	..D-D---EV.EH.....A.....S.....T.....P...I...R...I.....F...TV.....V.....I		84
Cyn d 7	..DT-----G.M.H.....T.....L...TDA.RT...TSAD...R...I.....DFD...IS.CN...P...M.....		80
Phl p 7	..D-----M.....T.....LS...TDA.RT...TSAD...R...I.....DFN...IS.CN...P...M.....		78
	***#	#####	

**Figure 5-1.** Comparison of amino acid sequences of Nic t 1 and Nic t 2 with putative homologues in other species. Bra r 1 and Bra r 2, turnip; Aln g 4, alder; Bet v 4, birch; Ole e 3, olive; Cyn d 7, Bermuda grass; Phl p 7, timothy grass. The two EF-hand motifs are shown above the sequences. The coordinating residues in the  $Ca^{2+}$ -binding loop are marked (x, y, z, -y, -x, -z). Dots and hyphens indicate the identical residues to those of Nic t 1 and gaps in sequences, respectively. Numbers of residues are shown on the right. Asterisks and sharps below the sequences indicate conserved and similar residues in all the sequences.



**Figure 5-2.** Subcellular localization of Nic t 1 in growing pollen tubes of *N. tabacum*. Semi *vivo*-germinated pollen tubes were fixed, incubated with anti-Nic t 1 antibody (A to C) or preimmune antibody (D to F), and visualized with FITC-conjugated secondary antibody. (A and D) Light microscope images. (B and E) Nuclear DNA staining of the same pollen tubes as shown in the left panels. (C and F) FITC-fluorescent image of the same pollen tubes as shown in the left panels. EP, empty pollen tube; SC, sperm cell; VN, vegetative nuclear. Bars = 50  $\mu$ m

## 論文審査結果要旨

本論文は、アブラナ属の花粉アレルゲン遺伝子を初めてクローニングし、新規なカルシウム結合タンパク質をコードする遺伝子であることを明らかにするとともに、この遺伝子の免疫療法への利用と、植物花粉における機能推定を行った研究をまとめたものである。

花粉症はアレルゲンとIgE抗体の抗原抗体反応の結果引き起こされる。本研究ではまず第1に、アブラナの葯から作成したcDNAライブラリーと花粉症患者のIgE抗体を用いて花粉アレルゲンをコードするcDNAクローンを2種類単離し、*Bra r1*および*Bra r2*と命名した。それらは、カルシウム結合部位を2カ所持つ新規なカルシウム結合タンパク質をコードすることを明らかにした。

続いて、*Bra r1*とIgE抗体との結合にCa<sup>2+</sup>が重要であることを明らかにし、さらに、Ca<sup>2+</sup>結合部位のアミノ酸を置換した変異型タンパク質を作成し、この変異型*Bra r1*が免疫療法に利用できる可能性を示した。この研究は、農学と医学にまたがった学際的研究として評価できる。*Bra r1*と*Bra r2*の植物における機能を明らかにするため、遺伝子発現についてさまざまな分子遺伝学的手法を用いて総合的に解析し、*Bra r1*が花粉管伸長に関与することを示唆した。他の植物を含め花粉アレルゲンの植物における機能はほとんど明らかにされておらず、本研究は先駆的研究である。

さらに、*Bra r1*のゲノミッククローンを単離し、形質転換タバコを用いてプロモーターの発現誘導解析を行った。タバコからも*Bra r1*ホモログをクローニングして遺伝子発現の解析を行い、*Bra r1*タイプのカルシウム結合タンパク質が伸長した花粉管の細胞質に存在することを明らかにした。花粉管伸長とカルシウム分布は密接な関係にあることが知られているので、*Bra r1*タイプのカルシウム結合タンパク質は細胞内カルシウムのレセプターとして花粉管伸長に関与していると推察した。

以上のように本研究は、花粉アレルゲン遺伝子について、植物の生殖における観点から新たな知見を与えるとともに、花粉症治療への応用を明らかにしたもので、植物機能科学の発展に対する貢献が顕著である。したがって審査員一同は、本論文の著者が博士(農学)の学位を授与されるに値するものと判断した。